



430
COPY OF PAPERS
ORIGINALLY FILED

1652
PATENT
Docket No. 21349/10

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

RECEIVED

MAY 13 2002

Applicants: Jean-Louis Escary

Group: 1653

Application No.: 10/087,325

Examiner: Unknown

TECH CENTER 1600/2900

Filed: March 1, 2002

For: *Polynucleotides and Polypeptides of the Interferon Alpha-2 Gene*

#3

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this paper (along with any paper referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to the: Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231 on:

By: *Deborah Celeste*
Deborah Celeste

April 30, 2002
Date

TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

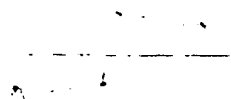
Sir:

The above-referenced patent application claims priority, pursuant to 35 U.S.C. §119, from French Patent Application No. FR 0102843, filed on March 1, 2001. To perfect this claim of priority, Applicant hereby submits a certified copy of the priority application of French Patent Application No. FR 0102843.

Respectfully submitted,

By: *Mark A. Hofer*

Mark A. Hofer
Reg. No. 30,068
Attorney for Applicants
Customer Number: 21710
Brown Rudnick Berlack Israels, LLP
One Financial Center
Boston, MA 02111
Tel: 617-856-8327
Fax: 617-856-8201





RECEIVED

MAY 13 2002

TECH CENTER 1600/2900

#10/087325

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 09 AVR. 2002

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr



[Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or introductory paragraph.]

[Faint, illegible text in the middle section of the page.]

[Faint, illegible text in the lower middle section of the page.]

[Faint, illegible text at the bottom of the page, possibly a conclusion or footer.]



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 190600

Réservé à l'INPI REMISE DES PIÈCES DATE 1 MARS 2001 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT 0102843 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE 01 MARS 2001 PAR L'INPI		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE RINUY, SANTARELLI 14, avenue de la Grande Armée 75017 PARIS	
Vos références pour ce dossier <i>(facultatif)</i> BIF022952/FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE Demande de brevet Demande de certificat d'utilité Demande divisionnaire <i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		Cochez l'une des 4 cases suivantes <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N° _____ Date ____/____/____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> N° _____ Date ____/____/____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Nouveaux polynucléotides comportant un polymorphisme de type SNP fonctionnel dans la séquence nucléotidique du gène IFNalpha-2 ainsi que de nouveaux polypeptides codés par ces polynucléotides et leurs utilisations thérapeutiques.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Adresse _____ Rue _____ _____ Code postal et ville _____ Pays _____ Nationalité _____ N° de téléphone <i>(facultatif)</i> _____ N° de télécopie <i>(facultatif)</i> _____ Adresse électronique <i>(facultatif)</i> _____		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» GenOdyssee Société Anonyme _____ _____ Parc d'Affaires Technopolis, 3 avenue du Canada, Bat Alpha, BP 810, LES ULIS 91974 COURTABOEUF FRANCE FRANÇAISE	



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 1 MARS 2001 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0102843		Réservé à l'INPI		DB 540 W / 260899	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>			BIF022952/FR		
6 MANDATAIRE					
Nom					
Prénom					
Cabinet ou Société			RINUY, SANTARELLI		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel					
Adresse	Rue	14 AVENUE DE LA GRANDE ARMEE			
	Code postal et ville	75017	PARIS		
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 40 55 43 43			
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>					
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>					
7 INVENTEUR (S)					
Les inventeurs sont les demandeurs			<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée		
8 RAPPORT DE RECHERCHE			Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé			<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Paiement échelonné de la redevance			Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES			Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):</i>		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes					
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. BLANCANEUX		
 Georges PERIN N°92.1191 RINUY, SANTARELLI					

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

5 La présente invention concerne de nouveaux polynucléotides comportant un polymorphisme de type SNP fonctionnel dans la séquence nucléotidique du gène IFN α -2 ainsi que de nouveaux polypeptides codés par ces polynucléotides et leurs utilisations thérapeutiques.

10 **ART ANTERIEUR**

 Le gène interféron alpha-2 humain (IFN α -2) est décrit dans les publications :

- Olopade Ol., Bohlander Sk. "Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human
15 neoplasia." Genomics. 1992 Oct;14(2):437-43 PMID: 1385305 ;
- Ezekowitz Ra., Mulliken Jb., "Interferon alfa-2a therapy for life-threatening hemangiomas of infancy" N. Engl. J. Med. 1992 May 28;326(22):1456-63. PMID: 1489383 ;
- Dithmar S., Rusciano D., "Neoadjuvant interferon alfa-2b treatment in a
20 murine model for metastatic ocular melanoma: a preliminary study" Arch. Ophthalmol. 2000 Aug;118(8):1085-9. PMID: 10922203;
- et notamment sous le numéro d'accès J00207, V11834 dans la base de données GenBank.

 Les IFN α sont connus pour leurs effets anti-prolifératifs cellulaires
25 et leurs implications dans les réponses anti-virales et anti-parasitaires.

 Les IFN α sont aussi connus pour inhiber l'expression de plusieurs autres cytokines au niveau des cellules hématopoïétiques souches, ainsi que pour inhiber la prolifération cellulaire de certaines tumeurs.

 Les IFN α sont également connus pour réduire l'expression des
30 récepteurs à l'EGF dans les carcinomes rénaux, pour inhiber l'expression de certains gènes mitochondriaux, pour inhiber la prolifération des fibroblastes, des monocytes et des lymphocytes B, notamment in-vitro et pour bloquer la

synthèse des anticorps, par les lymphocytes B.

Les $\text{IFN}\alpha$ sont également connus pour induire l'expression d'antigènes spécifiques de tumeurs à la surface de cellules tumorales et également pour induire les gènes placés sous le contrôle de régions
5 promotrices de type ISRE (Interferon-stimulated response element) en agissant sur les facteurs de transcription spécifiques de ces ISRE.

Il est connu que les $\text{IFN}\alpha$ sont impliqués dans différents dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les leucémies et
10 les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la
15 maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les désordres gastro-intestinaux ou encore les
20 désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

Les $\text{IFN}\alpha$ sont particulièrement utilisés pour le traitement de certaines leucémies, de carcinomes rénaux métastasés ainsi que des tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA. Les $\text{IFN}\alpha$ sont aussi efficaces contre d'autres
25 types de tumeurs et contre certaines infections virales. Les $\text{IFN}\alpha$ sont aussi reconnus par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement des verrues génitales ou vénériennes.

Toutefois, les $\text{IFN}\alpha$, et particulièrement les $\text{IFN}\alpha$ -2, présentent de nombreux effets secondaires lorsqu'ils sont employés dans des compositions
30 pharmaceutiques, tels que des réactions d'hypersensibilité aiguë (urticaire, broncho-constriction, choc anaphylactique, etc.), des arythmies cardiaques, des

hypotensions artérielles, des crises d'épilepsie, des troubles des fonctions thyroïdiennes, des syndromes pseudo-grippaux (fièvres, sueurs, myalgies), etc.

De plus, les patients traités par les IFN α peuvent développer des anticorps neutralisant ces molécules diminuant ainsi leurs efficacités.

5 La demanderesse a trouvé de nouveaux polypeptides et nouveaux polynucléotides analogues à l'IFN α -2, présentant une activité anti-proliférative cellulaire significativement inhibée par rapport à l'IFN α -2 naturel, pouvant être utilisés pour traiter ou prévenir les dérèglements ou maladies mentionnés précédemment et d'éviter tout ou partie des inconvénients mentionnés ci-
10 ,dessus.

L'INVENTION

L'invention a pour principal objet de nouveaux polynucléotides qui diffèrent de la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence de IFN α -
15 2, en ce qu'ils comportent un polymorphisme de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) fonctionnel.

Ainsi, le nucléotide guanine (g) en position 1023 est modifié en adénine (a) par rapport à la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence IFN α -2, comme il est mentionné dans la séquence nucléotidique ID
20 SEQ N° 1. Le polymorphisme de type SNP est donc appelé g1023a du gène IFN α -2.

Ce polymorphisme de type SNP a été identifié par la demanderesse au moyen du procédé de détermination décrit dans la demande de brevet FR 00 22894, intitulé "Procédé de détermination d'un ou plusieurs
25 polymorphisme(s) fonctionnel(s) dans la séquence nucléotidique d'un gène "candidat" fonctionnel présélectionné et ses applications" et déposée le 6 décembre 2000, cité ici à titre de référence.

La séquence nucléotidique ID SEQ N° 3 correspond à un fragment de 20 nucléotides qui se situe dans la séquence nucléotidique ID SEQ
30 N° 1 de la position 1011 à la position 1030. Ainsi, la séquence nucléotidique ID SEQ N° 3 inclut le polymorphisme de type SNP de l'invention.

L'IFN α -2 humain sauvage code pour une protéine immature de

188 acides aminés qui sera convertit en protéine mature de 165 acides aminés, par section du peptide signal qui comprend les 23 premiers acides aminés. La séquence nucléotidique codante de la protéine immature commence au nucléotide 511 (codon start) et finit au nucléotide 1077 (codon stop), dans la
5 séquence nucléotidique du gène IFN α -2 humain sauvage qui comporte 1733 nucléotides.

Le polymorphisme de type SNP de l'invention entraîne une modification de méthionine (M) en position 171 dans la protéine immature codée par la séquence nucléotidique du gène IFN α -2 en isoleucine (I), et en
10 position 148 de la protéine mature.

Le polypeptide comportant la mutation M171I du gène IFN α -2 correspond à la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 (protéine immature de 188 acides aminés). La séquence d'acides aminés de la protéine mature du gène de l'IFN α -2 comporte 165 acides aminés et correspond à la séquence
15 d'acides aminés comprise entre l'acide aminé 24 et 188 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 (protéine immature).

Dans la description de la présente invention, on appellera indifféremment M148I et M171I la mutation codée par le polymorphisme de type SNP de l'invention selon que l'on se réfère respectivement à la protéine mature
20 ou à la protéine immature.

Le polymorphisme de type SNP de l'invention entraîne une modification de la conformation spatiale d'un polypeptide conforme à l'invention par rapport au polypeptide codé par la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence. Une telle modification peut être observée par
25 modélisation moléculaire bio-informatique, selon des méthodes bien connues de l'homme du métier mettant en œuvre, par exemple, les outils de modélisation de-novo (par exemple, SEQFOLD/MSI), d'homologie (par exemple, MODELER/MSI), de minimisation des champs de force (par exemple, DISCOVER, DELPHI/MSI) et/ou de dynamique moléculaire (par exemple,
30 CFF/MSI).

Un exemple d'une telle modélisation est donnée ci-après dans la partie expérimentale. Ces outils ont ainsi permis une modélisation d'un polypeptide de l'invention.

La modélisation bio-informatique permet d'observer que la
5 mutation M148I sur la protéine mutée mature entraîne une modification des chaînes latérales proches du point de mutation, sur les hélices A et E de l'IFN α -2 naturel. La chaîne latérale mutée I148 s'engage dans un pont salin avec la chaîne latérale de E141, ce qui entraîne quelques modifications dans la conformation spatiale de la protéine mutée mature.

10 Alors que dans l'IFN α -2 naturel la chaîne latérale de R144 est orientée vers l'intérieur de la molécule dans sa conformation tridimensionnelle, cette chaîne latérale est orientée vers l'extérieur sur la protéine mutée mature. De même, les chaînes latérales R22 et E141 sont déplacées dans la protéine mutée mature.

15 Un génotypage d'un polynucléotide conforme à l'invention peut également être effectué de façon à déterminer la fréquence allélique de ce polynucléotide dans une population. Un exemple de génotypage est donné, ci-après, dans la partie expérimentale.

La détermination de la fonctionnalité d'un polypeptide de
20 l'invention peut également être effectuée par un test de mesure de l'effet anti-prolifératif sur la lignée cellulaire de Daudi en présence d'un polypeptide conforme à l'invention et d'un polypeptide codé par le gène sauvage de référence de l'IFN α -2 humain.

L'invention a aussi pour objet la mise en évidence et l'utilisation de
25 molécules thérapeutiques obtenues à partir de l'information dérivant d'un polynucléotide et d'un polypeptide conforme à l'invention, notamment pour la prévention et le traitement des différents dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les leucémies et les cancers du foie, du cou,
30 de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses comme les hépatites

B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

La Figure 1 représente la modélisation de la protéine codée par le polynucléotide de séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 et de la protéine codée par la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence.

La Figure 2 représente le résultat du génotypage du polymorphisme de type SNP conforme à l'invention dans une population d'individus.

Sur cette figure, les abscisses représentent la valeur mp du filtre Tamra (ddGTP) et les ordonnées représentent la valeur mp du filtre R-110 (ddATP).

En haut à droite, le groupe hétérozygote AG contient 1 individu.

En bas à droite, le groupe homozygote GG contient 237 individus.

En bas à gauche, le groupe d'individus contient 7 individus blancs et 1 individu non génotypé.

La Figure 3 représente le résultat du test de mesure de l'effet anti-prolifératif sur la lignée cellulaire de Daudi en présence d'un polypeptide conforme à l'invention et d'un polypeptide codé par le gène sauvage de référence de l'IFN α -2 humain.

Sur cette Figure, les abscisses correspondent au logarithme de la concentration protéique en picomolaires (pM) et les ordonnées correspondent au pourcentage de prolifération cellulaire.

L'effet anti-prolifératif de l'IFN α -2 sauvage est représenté par des triangles et l'effet anti-prolifératif de l'IFN α -2 muté est représenté par des ronds.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Définitions

On entend par "séquence nucléotidique du gène sauvage de référence", la séquence nucléotidique du gène IFN α -2 humain mentionnée dans la GenBank sous le numéro d'accès J00207, V11834 et mentionnée
5 notamment dans la publication Olopade Ol., Bohlander Sk. "Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia." Genomics. 1992 Oct;14(2):437-43 PMID: 1385305.

10 On entend par "IFN α -2 naturel" le polypeptide codé par la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence.

On entend par "polynucléotide", un polyribonucléotide ou un polydésoxyribonucléotide qui peut être un ADN ou un ARN modifié ou non.

Le terme polynucléotide inclut, par exemple, un ADN simple brin
15 ou double brin, un ADN composé d'un mélange d'une ou plusieurs région(s) simple brin et d'une ou plusieurs région(s) double brins, un ARN simple brin ou double brin et un ARN composé d'un mélange d'une ou plusieurs région(s) simple brin et d'une ou plusieurs région(s) double brins. Le terme polynucléotide peut aussi comprendre un ARN et/ou un ADN comprenant une ou plusieurs
20 régions triple brins. On entend également par polynucléotide les ADNs et ARNs contenant une ou plusieurs bases modifiées de façon à avoir un squelette modifié pour la stabilité ou pour d'autres raisons. On entend par base modifiée, par exemple, les bases inhabituelles telles que l'inosine.

On entend par "polypeptide", un peptide, un oligopeptide, un
25 oligomère ou une protéine comprenant au moins deux acides aminés joints l'un à l'autre par une liaison peptidique normale ou modifiée, comme dans le cas des peptides isostères, par exemple.

Un polypeptide peut être composé d'autres acides aminés que les
20 acides aminés codés par les gènes humains. Un polypeptide peut également être composé d'acides aminés modifiés par des processus naturels,
30 tel que le processus de maturation post-traductionnel ou par des procédés chimiques, qui sont bien connus de l'homme du métier. De telles modifications

sont bien détaillées dans la littérature. Ces modifications peuvent apparaître n'importe où dans le polypeptide : dans le squelette peptidique, dans la chaîne d'acides aminés ou encore aux extrémités carboxy- ou amino-terminales.

Un polypeptide peut être ramifié suite à une ubiquitination ou être cyclique avec ou sans ramification. Ce type de modifications peut être le résultat de processus de post-translation naturel ou synthétique, qui sont bien connus de l'homme du métier.

On entend, par exemple, par modifications d'un polypeptide, l'acétylation, l'acylation, l'ADP-ribosylation, l'amidation, la fixation covalente de flavine, la fixation covalente d'un hème, la fixation covalente d'un nucléotide ou d'un dérivé nucléotidique, la fixation covalente d'un lipide ou d'un dérivé lipidique, la fixation covalente d'un phosphatidylinositol, la réticulation covalente ou non-covalente, la cyclisation, la formation de pont disulfure, la déméthylation, la formation de cystéine, la formation de pyroglutamate, la formylation, la gamma-carboxylation, la glycosylation, la formation d'ancre au GPI, l'hydroxylation, l'iodisation, la méthylation, la myristoylation, l'oxydation, le processus protéolytique, la phosphorylation, la prénylation, la racémisation, la sénéloylation, la sulfatation, l'addition d'acides aminés telle que l'arginylation ou l'ubiquitination. De telles modifications sont bien détaillées dans la littérature :

PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, New York, 1993, POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983, Seifter et al. "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth. Enzymol. (1990) 182 :626-646 et Rattan et al. "Protein Synthesis : Post-translational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci (1992) 663 :48-62.

On entend par "variant", un polynucléotide ou un polypeptide qui diffère respectivement d'au moins un nucléotide ou d'au moins un acide aminé par rapport à un polynucléotide ou à un polypeptide conforme à l'invention, mais qui garde les mêmes propriétés intrinsèques, c'est à dire la même, ou pratiquement la même fonctionnalité.

Un changement dans la séquence nucléotidique du variant peut altérer ou non la séquence d'acides aminés du polypeptide qu'il code, par rapport à un polypeptide de l'invention. Un changement de nucléotide dans le polynucléotide variant peut résulter en une substitution d'un acide aminé, une
5 addition, une délétion, une fusion ou une troncation dans le polypeptide variant codé par ledit polynucléotide variant, par rapport à un polypeptide de l'invention. Un polypeptide variant diffère généralement d'un polypeptide de l'invention par une (ou plusieurs) substitution(s), addition(s) ou délétion(s) ou plusieurs de ces modifications, pris en combinaison. Un variant non-naturel d'un polynucléotide
10 ou d'un polypeptide peut être obtenu, par exemple, par mutagenèse dirigée ou par synthèse directe.

On entend par "identité", la mesure d'identité d'une séquence nucléotidique ou polypeptidique. L'identité est un terme bien connu de l'homme du métier et de la littérature. Voir COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY,
15 Lesk, A.M., Ed., Oxford University Press, New York, 1998; BIOCOMPUTING INFORMATICS AND GENOME PROJECT, Smith, D.W., Ed., Academic Press, New York, 1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A.M. and Griffin H.G., Ed, Humana Press, New Jersey, 1994; et SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic
20 Press, 1987.

Les méthodes communément employées pour déterminer l'identité et la similarité entre deux séquences sont également bien décrites dans la littérature. Voir GUIDE TO HUGE COMPUTER, Martin J. Bishop, Ed, Academic Press, San Diego, 1994, et Carillo H. and Lipton D., Siam J Applied
25 Math (1988) 48 :1073.

Un polynucléotide ayant, par exemple, une identité d'au moins 95 % avec le polynucléotide ID SEQ N° 1 est un polynucléotide qui comporte au plus 5 nucléotides modifiés sur 100 nucléotides, par rapport à ladite séquence.

On entend par "polymorphisme de type SNP", toute variation
30 naturelle d'une base dans une séquence nucléotidique.

On entend par "polymorphisme de type SNP fonctionnel", un polymorphisme de type SNP qui a pour conséquence de modifier la

fonctionnalité d'un polynucléotide ou d'un polypeptide codé par ce polynucléotide.

On entend par "fonctionnalité", l'activité biologique d'un polypeptide ou d'un polynucléotide codant pour ce polypeptide.

5 La fonctionnalité d'un polypeptide conforme à l'invention ou d'un polynucléotide codant pour ce polypeptide peut consister en une augmentation, une diminution ou une suppression de l'activité biologique, voire un changement de nature de l'activité biologique du polypeptide codé par la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence ou de cette séquence.

10 L'activité biologique peut, notamment, être liée à l'affinité ou à l'absence d'affinité du polypeptide vis-à-vis d'un ligand, tel qu'un récepteur.

On considérera, dans le cadre de la présente invention, qu'un variant possède la même ou pratiquement la même fonctionnalité qu'un polynucléotide ou un polypeptide de l'invention si l'on obtient une inhibition de
15 l'effet anti-prolifératif cellulaire, déterminée selon le test décrit dans l'exemple 3 de la partie expérimentale, supérieure à 90%.

Polynucléotide

La présente invention a pour premier objet un polynucléotide isolé
20 comprenant :

- a) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité, préférentiellement au moins 90 % d'identité, encore plus préférentiellement au moins 95 % d'identité, avec la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 et ayant la même, ou pratiquement la même fonctionnalité que la séquence
25 nucléotidique ID SEQ N° 1,
- b) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité, préférentiellement au moins 90 % d'identité, encore plus préférentiellement au moins 95 % d'identité, avec la séquence nucléotidique codante de la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 (du nucléotide 511 au nucléotide 1077)
30 et ayant la même, ou pratiquement la même fonctionnalité que la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1, ou
- c) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique

décrite sous a) ou sous b).

La présente invention concerne également un polynucléotide isolé comprenant :

- 5 a) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité, préférentiellement au moins 90 % d'identité, encore plus préférentiellement au moins 95 % d'identité avec la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 et comportant la séquence nucléotidique ID SEQ N° 3,
- 10 b) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité, préférentiellement au moins 90 % d'identité, encore plus préférentiellement au moins 95 % d'identité avec la séquence nucléotidique codante de la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 (du nucléotide 511 au nucléotide 1077) et comportant la séquence nucléotidique ID SEQ N° 3, ou
- c) la séquence nucléotidique complémentaire à la séquence nucléotidique décrite sous a) ou sous b).

15 Ainsi, une séquence nucléotidique selon l'invention peut comprendre les 20 nucléotides de la séquence ID SEQ N° 3, celle ci étant un fragment de la dite séquence ID SEQ N° 1 (du nucléotide 1011 au nucléotide 1030). Préférentiellement, une séquence nucléotidique selon l'invention peut comprendre 10 nucléotides de la séquence ID SEQ N° 3 (du nucléotide 1018 au

20 nucléotide 1027 de la séquence ID SEQ N° 1) et encore plus préférentiellement 5 nucléotides de la séquence ID SEQ N° 3 (du nucléotide 1021 au nucléotide 1025 de la séquence ID SEQ N° 1).

Le polynucléotide isolé conforme à l'invention comprend, plus particulièrement :

- 25 a) la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1,
- b) la séquence nucléotidique codante de la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1, telle que définie ci-dessus, ou
- c) la séquence nucléotidique complémentaire à la séquence nucléotidique sous a) ou sous b).

30 Le polynucléotide isolé conforme à l'invention consiste, tout particulièrement, en la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante (du nucléotide 511 au nucléotide 1077).

La présente invention concerne aussi un polynucléotide isolé codant pour un polypeptide comprenant :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou
- b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre
5 24 et 188 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2.

Préférentiellement le polynucléotide conforme à l'invention comprend une molécule d'ADN ou d'ARN.

Le polynucléotide de l'invention peut être obtenu par les méthodes standards de synthèse d'ADN ou d'ARN. Ce polynucléotide peut également être
10 obtenu par mutagenèse dirigée à partir de la séquence nucléotidique du gène IFN α -2 en modifiant le nucléotide g par le nucléotide a en position 1023. Les procédés de mutagenèse dirigée qui peuvent ainsi être mis en œuvre sont bien connus de l'homme du métier. On peut notamment évoquer la publication de TA Kunkel en 1985 dans "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 82:488.

15 Le polynucléotide isolé peut également comprendre, par exemple, des séquences nucléotidiques codant pour des séquences d'acides aminés pre-, pro- ou pre-pro-protéine ou des séquences d'acides aminés marqueurs, comme l'hexa-histidine peptide.

Le polynucléotide de l'invention peut également contenir des
20 séquences nucléotidiques codant pour d'autres protéines ou fragments de protéines en vue d'obtenir des protéines de fusion ou à des fins de purification.

Le polynucléotide conforme à l'invention peut également comprendre des séquences nucléotidiques comme les séquences 5' et/ou 3' non-codantes, telles que, par exemple, des séquences transcrites, des
25 séquences non-translatées, des séquences signal d'épissage, des séquences polyadénylées, des séquences de liaison avec des ribosomes ou encore des séquences qui stabilisent l'ARNm.

On définit comme séquence nucléotidique complémentaire à la séquence nucléotidique un polynucléotide qui peut être hybridé avec cette
30 séquence nucléotidique, dans des conditions stringentes.

On entend généralement, mais pas nécessairement, par "conditions stringentes d'hybridation" les conditions chimiques qui permettent

une hybridation lorsque les séquences nucléotidiques ont une identité d'au moins 80 %, de préférence supérieure ou égale à 90 %, encore plus préférentiellement supérieure ou égale à 95 % et tout particulièrement supérieure ou égale à 97 %.

- 5 Ces conditions peuvent être obtenues selon les méthodes bien connues de l'homme du métier et, par exemple, par une incubation des polynucléotides, à 42° C, dans une solution comprenant 50 % de formamide, 5xSSC (150 Mm de NaCl, 15 mM de trisodium citrate), 50 Mm de sodium phosphate (pH = 7,6), 5x Solution Denhardt, 10 % de dextran sulfate et 20 µg
10 d'ADN de sperme de saumon dénaturé, suivi d'un lavage des filtres à 0,1x SSC, à 65° C.

Identification, hybridation et/ou amplification d'un polynucléotide comportant le polymorphisme de type SNP

- 15 La présente invention a aussi pour objet l'utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide défini précédemment, pour identifier, hybrider et/ou amplifier tout ou partie d'un polynucléotide comportant le polymorphisme de type SNP g1023a du gène IFN α -2.

- Ainsi, par exemple, tout ou partie d'un polynucléotide conforme à
20 l'invention, qui est identique ou suffisamment identique, à la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou à sa séquence codante (du nucléotide 511 au nucléotide 1077), à la séquence nucléotidique ID SEQ N° 3, ou à un de ses fragments comprenant le polymorphisme de type SNP conforme à l'invention, peut être utilisé comme sonde d'hybridation pour isoler l'ADNc ou l'ADN
25 génomique de la séquence ID SEQ N° 1, de sa séquence codante (du nucléotide 511 au nucléotide 1077) ou de la séquence ID SEQ N° 3.

Génotypage et détermination de la fréquence du polymorphisme de type SNP

La présente invention a également pour objet l'utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide conforme à l'invention comme outil de
5 génotypage.

La présente invention a aussi pour objet un procédé de détermination de la fréquence du polymorphisme de type SNP d'un polynucléotide conforme à l'invention dans lequel on procède à un génotypage chez un individu ou dans une population d'individus.

10 Au sens de l'invention, on définit le génotypage comme un procédé de détermination du génotype d'un individu ou d'une population d'individus.

On entend par "population d'individus", un groupe d'individus déterminés de façon aléatoire ou non. Ces individus peuvent être des humains,
15 des animaux ou des plantes.

Les individus peuvent être choisis selon leur ethnie ou selon leur phénotype, notamment ceux qui sont atteints par les dérèglements et/ou maladies suivantes : les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les leucémies et les cancers du
20 foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcératives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie
25 d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements
30 par chimiothérapie.

Le polymorphisme de type SNP fonctionnel conforme à l'invention est préférentiellement génotypé dans une population d'individus.

Le génotypage peut être effectué par un miniséquençage avec des ddNTPs chauds (2 ddNTPs différents marqués par des fluorophores différents) et froids (2 ddNTPs non marqués), en liaison avec un lecteur de fluorescence polarisé. Le protocole de miniséquençage avec lecture de fluorescence polarisée (Technologie FP-TDI ou Fluorescence Polarization Template-direct Dye-Terminator Incorporation) est bien connu de l'homme du métier.

Il peut être réalisé sur un produit obtenu après amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de l'ADN de chaque individu. Ce produit PCR est choisi pour couvrir la région génique du polynucléotide contenant le polymorphisme de type SNP étudié. Après la dernière étape dans le thermocycleur de la PCR, la plaque est alors placée sur un lecteur de fluorescence polarisée pour la lecture des bases marquées en utilisant les filtres d'excitation et d'émission spécifique des fluorophores. Les valeurs d'intensité des bases marquées sont reportées sur un graphe.

Les amorces respectivement sens et antisens pour l'amplification PCR, dans le cas du polymorphisme de type SNP de l'invention, peuvent comprendre par exemple les séquences nucléotidiques ID SEQ N° 4 et ID SEQ N° 5.

Ces séquences nucléotidiques permettent d'amplifier un fragment d'une longueur de 655 nucléotides, du nucléotide 470 au nucléotide 1124 dans la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1.

Une analyse statistique de la fréquence de chaque allèle (fréquence allélique) codé par le gène comportant le SNP dans la population d'individus est alors effectuée, ce qui permet de déterminer l'importance de leur impact et leur répartition dans les différents sous-groupes et notamment, le cas échéant, les diverses ethnies qui constituent cette population d'individus.

Les données de génotypage sont analysées pour estimer les fréquences de distributions des différents allèles observés dans les populations étudiées. Les calculs de fréquences alléliques peuvent être réalisés à l'aide de logiciels tels SAS-suite® (SAS) ou SPLUS® (MathSoft). La comparaison des distributions alléliques du polymorphisme de type SNP de l'invention au travers

des différentes ethnies de la population d'individus peut être réalisée au moyen des logiciels ARLEQUIN® et SAS-suite®.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polynucléotide conforme à l'invention pour la recherche d'une variation dans la
5 séquence nucléotidique du gène IFN α -2 chez un individu.

Vecteur d'expression et cellule hôte

La présente invention a aussi pour objet un vecteur recombinant comprenant au moins un polynucléotide conforme à l'invention.

10 De nombreux systèmes d'expression peuvent être utilisés, comme, par exemple, les chromosomes, les épisomes, les virus dérivés. Plus particulièrement, les vecteurs recombinants utilisés peuvent être dérivés de plasmides bactériens, de transposons, d'épisome de levure, d'éléments d'insertion, d'éléments chromosomiques de levures, de virus tels que les
15 baculovirus, les papillonna virus comme SV40, les vaccinia virus, les adénovirus, les fox pox virus, les pseudorabies virus, les rétrovirus.

Ces vecteurs recombinants peuvent également être des dérivés de cosmides ou de phagemides. La séquence nucléotidique peut être insérée dans le vecteur recombinant d'expression par les méthodes bien connues de
20 l'homme du métier, telles que, par exemple, celles qui sont décrites dans MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (supra) Sambrook et al..

Le vecteur recombinant peut comprendre des séquences nucléotidiques de contrôle de la régulation de l'expression du polynucléotide ainsi que des séquences nucléotidiques permettant l'expression et la
25 transcription d'un polynucléotide de l'invention et la traduction d'un polypeptide de l'invention, ces séquences étant choisies en fonction des cellules hôtes mises en œuvre.

Ainsi, par exemple, un signal de sécrétion approprié peut être intégré dans le vecteur recombinant pour que le polypeptide, codé par le
30 polynucléotide de l'invention, soit dirigé vers la lumière du réticulum endoplasmique, vers l'espace périplasmique, sur la membrane ou vers l'environnement extracellulaire.

La présente invention a aussi pour objet une cellule hôte comprenant un vecteur recombinant conforme à l'invention.

L'introduction du vecteur recombinant dans une cellule hôte peut être effectuée selon les méthodes bien connues de l'homme du métier telles que celles décrites dans BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis et al., 1986 et MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, telles que la transfection par calcium phosphate, la transfection par DEAE dextran, la transvection, la microinjection, la transfection par lipides cationiques, l'électroporation, la transduction ou l'infection.

Les cellules hôtes peuvent être, par exemple, des cellules bactériennes telles que les cellules de streptocoque, de staphylocoque, d'*E. coli* ou de *Bacillus subtilis*, des cellules de champignons telles que les cellules de levure et les cellules d'*Aspergillus*, de *Streptomyces*, des cellules d'insectes telles que les cellules de *Drosophila* S2 et de *Spodoptera* Sf9, des cellules animales, telles que les cellules CHO, COS, HeLa, C127, BHK, HEK 293 et des cellules humaines du sujet à traiter ou encore des cellules végétales.

Les cellules hôtes peuvent être utilisées, par exemple, pour exprimer un polypeptide de l'invention ou en tant que produit actif dans des compositions pharmaceutiques, comme on le verra ci-après.

Polypeptide

La présente invention a aussi pour objet un polypeptide comprenant :

- 25 a) une séquence d'acides aminés ayant au moins 80 % d'identité, préférentiellement au moins 90 % d'identité, encore plus préférentiellement au moins 95 % d'identité avec la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 et ayant la même, ou pratiquement la même fonctionnalité que la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou
- 30 b) une séquence d'acides aminés ayant au moins 80 % d'identité, préférentiellement au moins 90 % d'identité, encore plus préférentiellement au moins 95 % d'identité avec la séquence d'acides aminés comportant les

acides aminés compris entre 24 et 188 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 et ayant la même, ou pratiquement la même fonctionnalité que la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2.

5 Ainsi, un polypeptide conforme à l'invention peut comprendre des variants de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 ou de la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 188 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2. Néanmoins, par définition, ces variants doivent conférer la même, ou pratiquement la même fonctionnalité que la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2.

10 Le polypeptide de l'invention peut également comprendre la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 ou la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 188 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2.

15 Le polypeptide de l'invention peut tout particulièrement consister en la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 ou la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 188 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2.

20 La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un polypeptide ci-dessus décrit, dans lequel une cellule hôte définie précédemment est cultivée et ledit polypeptide est isolé du milieu de culture.

25 Le polypeptide peut être purifié à partir des cellules hôtes, selon les méthodes bien connues de l'homme du métier telles que la précipitation à l'aide d'agents chaotropiques comme les sels, en particulier le sulfate d'ammonium, l'éthanol, l'acétone ou l'acide trichloroacétique, l'extraction à l'acide; la chromatographie échangeuse d'ions; la chromatographie par phosphocellulose; la chromatographie par interaction hydrophobe; la chromatographie d'affinité; la chromatographie hydroxylapatite ou les chromatographies d'exclusion.

30 On entend par "milieu de culture", le milieu dans lequel on purifie le polypeptide de l'invention. Ce milieu peut être constitué par le milieu extracellulaire et/ou le lysat cellulaire. Des techniques bien connues de

l'homme du métier permettent également à ce dernier de redonner la conformation active au polypeptide, si la conformation dudit polypeptide a été altérée lors de l'isolation ou de la purification.

5 Anticorps

La présente invention a aussi pour objet un procédé d'obtention d'un anticorps immunospécifique.

On entend par "anticorps", les anticorps monoclonaux, polyclonaux, chimériques, simple chaîne, humanisés ainsi que les fragments
10 Fab, incluant les produits d'un Fab ou d'une banque d'expression d'immunoglobulines.

Un anticorps immunospécifique peut être obtenu par immunisation d'un animal avec un polypeptide conforme à l'invention.

L'invention concerne aussi un anticorps immunospécifique pour un
15 polypeptide conforme à l'invention, tel que défini précédemment.

Un polypeptide selon l'invention, un de ses fragments, un analogue, un de ses variants ou une cellule exprimant ce polypeptide peuvent aussi être utilisés pour produire des anticorps immunospécifiques.

Le terme "immunospécifique" signifie que l'anticorps possède une
20 meilleure affinité pour le polypeptide de l'invention que pour d'autres polypeptides connus de l'art antérieur.

Les anticorps immunospécifiques peuvent être obtenus par administration d'un polypeptide de l'invention, d'un de ses fragments, d'un analogue ou d'un fragment épitopique ou d'une cellule exprimant ce
25 polynucléotide chez un mammifère, de préférence non humain, selon les méthodes bien connues de l'homme du métier.

Pour la préparation d'anticorps monoclonaux, on peut utiliser des méthodes usuelles de production d'anticorps, à partir de lignées cellulaires, telles que la technique des hybridomes (Kohler et al., Nature (1975) 256 :495-
30 497), la technique des triomes, la technique des hybridomes de cellules B humaines (Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4 :72) et la technique des

hybridomes EBV (Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, 1985).

Les techniques de production d'anticorps simple-chaîne telles que décrites, par exemple, dans US N° 4,946, 778 peuvent être également utilisées.

5 Des animaux transgéniques comme les souris, par exemple, peuvent être également utilisés pour produire des anticorps humanisés.

Agents interagissant avec le polypeptide de l'invention

La présente invention a également pour objet un procédé
10 d'identification d'un agent activateur ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention, comprenant :

- a) la mise en présence de cellules hôtes, telles que définies ci-dessus avec un agent à tester, et
- b) la détermination de l'effet activateur, ou inhibiteur, généré par l'agent à tester.

15 Un polypeptide conforme à l'invention peut ainsi être employé pour un procédé de criblage de composés qui rentrent en interaction avec celui-ci.

Ces composés peuvent être des agents activateurs (agonistes) ou inhibiteurs (antagonistes) de l'activité intrinsèque d'un polypeptide selon
20 l'invention. Ces composés peuvent également être des ligands ou des substrats d'un polypeptide de l'invention. Voir Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1 (2), Chapter 5 (1991).

En général, pour mettre en place un tel procédé, il est d'abord souhaitable de produire des cellules hôtes appropriées qui expriment un
25 polypeptide conforme à l'invention. De telles cellules peuvent être, par exemple, des cellules de mammifères, de levures, d'insectes comme *Drosophila* ou de bactéries comme *E. coli*.

Ces cellules ou des extraits de membrane de ces cellules, sont alors mises en présence des composés à tester.

30 On peut ainsi observer la capacité de liaison des composés à tester avec le polypeptide de l'invention, mais également l'inhibition ou l'activation de la réponse fonctionnelle.

L'étape b) du procédé ci-dessus peut être mise en œuvre en utilisant un agent à tester marqué directement ou indirectement. Elle peut aussi comprendre un test de compétition, en utilisant un agent marqué ou non et un agent compétiteur marqué.

- 5 On peut également déterminer si un agent à tester conduit à la génération d'un signal d'activation ou d'inhibition sur des cellules exprimant le polypeptide de l'invention, en utilisant des moyens de détection appropriés, suivant le signal à détecter.

De tels agents activateurs ou inhibiteurs peuvent être des
10 polynucléotides, et dans certains cas des oligonucléotides ou des polypeptides, comme des protéines ou des anticorps, par exemple.

La présente invention a aussi pour objet une méthode pour l'identification d'un agent activé ou inhibé par un polypeptide conforme à l'invention, comprenant :

- 15 a) la mise en présence de cellules hôtes obtenues comme décrit ci-dessus avec un agent à tester, et
b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur, généré par ledit polypeptide sur l'agent à tester.

Un agent activé ou inhibé par le polypeptide de l'invention est un
20 agent qui répond, respectivement, par une activation ou une inhibition en présence de ce polypeptide. Les agents activés ou inhibés, directement ou indirectement, par le polypeptide de l'invention peuvent consister en des polypeptides comme, par exemple, des récepteurs membranaires ou nucléaires, des kinases et plus préférentiellement des tyrosines kinases, des
25 facteurs de transcription ou des polynucléotides.

Détection de maladies

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polynucléotide conforme à l'invention pour donner des moyens pour effectuer
30 un diagnostic génétique d'une maladie ou d'une résistance à une maladie liée à la présence, chez un ou plusieurs individus de la population humaine, de l'allèle

mutant codé par le polymorphisme de type SNP fonctionnel conforme à l'invention.

La présente invention a aussi pour objet un procédé de détection de l'expression et/ou de l'activité d'un polypeptide conforme à l'invention,
5 comprenant :

- a) la détection de la présence ou de l'absence d'un polynucléotide selon l'invention dans le génome du sujet, et/ou
- b) la détection de la présence, de l'absence et/ou d'une concentration prédéterminée d'un polypeptide selon l'invention chez un sujet.

10 La détection d'un polynucléotide et d'un polypeptide de l'invention peut ainsi permettre de savoir si un sujet est atteint ou risque d'être atteint ou, au contraire, présente une résistance partielle au développement d'une maladie, d'une indisposition ou d'un dérèglement tels que définis précédemment, relatifs à l'expression et/ou l'activité d'un polypeptide de
15 l'invention.

La concentration "normale" d'un polypeptide peut être prédéterminée par l'homme du métier par des tests ou des essais conventionnels qui lui permettront d'identifier le seuil au-dessus ou en dessous duquel apparaît la sensibilité ou, au contraire, la résistance à la maladie,
20 l'indisposition ou le dérèglement évoqué ci-dessus.

Le polynucléotide à tester peut être obtenu à partir d'échantillons biologiques du sujet à étudier, tels que des cellules, du sang, de l'urine, de la salive, ou à partir d'une biopsie ou d'une autopsie du sujet à étudier. L'ADN génomique peut être utilisé directement pour la détection ou après à une
25 amplification par PCR, par exemple. L'ARN ou l'ADNc peuvent également être utilisés de façon similaire.

Il est ensuite possible de comparer la séquence nucléotidique d'un polynucléotide conforme à l'invention avec la séquence nucléotidique détectée dans le génome du sujet.

30 La comparaison des séquences nucléotidiques peut être effectuée par séquençage par des méthodes d'hybridation de l'ADN, par différence de mobilité des fragments d'ADN sur gel d'électrophorèse avec ou sans agents

dénaturants ou par différence de températures de fusion. Voir Myers et al., Science (1985) 230 :1242. De telles modifications dans la structure de la séquence nucléotidique en un point précis peuvent également être révélées par des essais de protection aux nucléases, telles que l'ARNase et la nucléase S1
5 ou encore par des agents chimiques de clivage. Voir Cotton et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1985) 85 :4397-4401. Des sondes oligonucléotidiques comprenant un fragment d'un polynucléotide de l'invention peuvent également être utilisées pour conduire le criblage.

De nombreuses méthodes bien connues de l'homme du métier
10 peuvent être utilisées pour déterminer l'expression d'un polynucléotide de l'invention et pour identifier la variabilité génétique de ce polynucléotide. Voir Chee et al., Science (1996), Vol 274, pp 610-613.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polynucléotide conforme à l'invention pour effectuer un diagnostic génétique
15 d'une maladie ou d'une résistance à une maladie liée à la présence, chez un ou plusieurs individus de la population humaine, de l'allèle mutant codé par le polymorphisme de type SNP fonctionnel conforme à l'invention.

Ces maladies peuvent être des dérèglements et/ou des maladies humaines, tels que les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes,
20 les mélanomes, les lymphomes, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du
25 système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns,
30 les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

De même, la présence, l'absence et/ou la concentration de polypeptide selon l'invention peuvent aider au diagnostic d'une maladie, une indisposition ou un dérèglement ou, au contraire, la résistance à une maladie, une indisposition ou un dérèglement chez un sujet en prélevant un échantillon
5 dérivé de ce sujet.

L'augmentation ou la diminution de l'expression du polypeptide peut être mesurée en quantifiant le niveau d'ARN codant pour ce polypeptide, suivant les méthodes bien connues de l'homme du métier, par exemple, par PCR, RT-PCR, protection à l'ARNase, Northern blot, et autres méthodes
10 d'hybridation.

Il est également possible de déterminer la concentration en polypeptides de l'invention présents dans un échantillon biologique du sujet par des méthodes bien connues, par exemple, par radioimmunoessai, tests de liaisons compétitives, Western blot et tests ELISA.

15

Médicaments et traitements des maladies

Les polypeptides de l'invention possèdent de très intéressantes propriétés pharmacologiques. Ils sont notamment capables de se fixer sur le récepteur de l'IFN α -2 humain.

20

Ces propriétés justifient l'utilisation d'un polypeptide conforme à l'invention pour le traitement thérapeutique du corps humain, c'est-à-dire à titre de médicament.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un médicament renfermant, à titre de principe actif, un polypeptide conforme à l'invention et en particulier un polypeptide comprenant la séquence ID SEQ N° 2, et plus
25 particulièrement encore, le polypeptide de séquence ID SEQ N° 2.

L'invention concerne encore l'utilisation d'un polypeptide conforme à l'invention, pour la fabrication d'un médicament destinée à la prévention ou au traitement de différents dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les
30 différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui

ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcératives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

10 Certains des composés permettant d'obtenir le polypeptide conforme à l'invention ainsi que les composés obtenus ou identifiés par ou à partir de ce polypeptide peuvent également être utilisés pour le traitement thérapeutique du corps humain, c'est-à-dire à titre de médicament.

C'est pourquoi la présente invention a aussi pour objet un médicament contenant, à titre de principe actif un polynucléotide conforme à l'invention, un vecteur recombinant défini précédemment, une cellule hôte définie précédemment, un anticorps défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention.

L'invention concerne encore l'utilisation d'un polynucléotide conforme à l'invention, d'un vecteur recombinant défini précédemment, d'une cellule hôte définie précédemment, d'un anticorps défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention, pour la fabrication d'un médicament destinée à la prévention ou au traitement de différents dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcératives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie chez les

patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

5 Le dosage d'un polypeptide et des autres composés de l'invention, utiles en tant que principe actif, dépend du choix du composé, du mode d'administration, de la nature de la formulation, de la nature du sujet et du jugement du médecin.

Lorsqu'il est utilisé comme principe actif, un polypeptide conforme
10 à l'invention est généralement administré à des doses comprises entre 1 et 100 µg/kg du sujet.

L'invention a aussi pour objet une composition pharmaceutique qui renferment au moins un composé précité, tel qu'un polypeptide conforme à l'invention, un polynucléotide conforme à l'invention, un vecteur recombinant
15 défini précédemment, une cellule hôte définie précédemment, un anticorps défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention, à titre de principe actif, ainsi qu'un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Dans ces compositions pharmaceutiques, le principe actif est
20 avantageusement présent à des doses physiologiquement efficaces.

Ces compositions pharmaceutiques peuvent être, par exemple, solides ou liquides et se présenter sous les formes pharmaceutiques couramment utilisées en médecine humaine, comme par exemple les comprimés simples ou dragéifiés, les gélules, les granulés, les caramels, les
25 suppositoires et de préférence les préparations injectables et les poudres pour injectables. Ces formes pharmaceutiques peuvent être préparées selon les méthodes usuelles.

Le ou les principes actifs peuvent y être incorporés à des excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques,
30 tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le dextrose, le glycérol, l'éthanol, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques,

les glycols, les divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs.

Le ou les principes actifs conforme à l'invention peuvent être employés seul ou en combinaison avec d'autres composés, tels que des composés thérapeutiques tels que d'autres IFNs α , voire d'autres cytokines
5 comme l'interleukine, par exemple.

Les différentes formulations des compositions pharmaceutiques sont adaptées suivant le mode d'administration.

Les compositions pharmaceutiques peuvent être administrées par
10 les différentes voies d'administration connues de l'homme du métier.

L'invention a également pour objet une composition de diagnostic qui renferment au moins un composé précité, tel qu'un polypeptide conforme à l'invention, un polynucléotide conforme à l'invention, un vecteur recombinant défini précédemment, une cellule hôte définie précédemment, un anticorps
15 défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention, à titre de principe actif, ainsi qu'un excipient approprié pharmaceutiquement acceptable.

Les excipients appropriés utilisés dans la composition de diagnostic sont généralement des tampons et des conservateurs.

20 La présente invention a également pour objet l'utilisation :

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent activateur défini précédemment et/ou
 - b) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide selon l'invention, et/ou
 - 25 c) d'un polynucléotide selon l'invention, et/ou
 - d) d'une cellule hôte du sujet à traiter, définie précédemment,
- pour préparer un médicament destiné à augmenter l'expression ou l'activité chez un sujet, d'un polypeptide conforme à l'invention.

Ainsi, pour traiter un sujet qui a besoin d'une augmentation de
30 l'expression ou de l'activité d'un polypeptide de l'invention, plusieurs méthodes sont possibles.

Il est possible d'administrer au sujet une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide de l'invention et/ou d'un agent activateur et/ou activé tels que définis précédemment, éventuellement en combinaison, avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

5 Il est également possible d'augmenter la production endogène d'un polypeptide de l'invention par administration au sujet d'un polynucléotide selon l'invention. Par exemple, ce polynucléotide peut être inséré dans un vecteur rétroviral d'expression. Un tel vecteur peut être isolé à partir de cellules ayant été infectées par un vecteur de plasmide rétroviral contenant de l'ARN
10 codant pour le polypeptide de l'invention, de telle façon pour que les cellules transduites produisent des particules virales infectieuses contenant le gène d'intérêt. Voir Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, Chapter 20, in Human Molecular Genetics, Strachan and Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996).

15 Il est également possible d'administrer au sujet des cellules hôtes lui appartenant, ces cellules hôtes ayant été prélevées et modifiées, au préalable, de façon à exprimer le polypeptide de l'invention, comme décrit précédemment.

La présente invention concerne également l'utilisation

- 20 a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent inhibiteur défini précédemment, et/ou
b) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un anticorps immunospcifique défini précédemment, et/ou
c) d'un polynucléotide permettant d'inhiber l'expression d'un polynucléotide
25 conforme à l'invention,
pour préparer un médicament destiné à diminuer l'expression ou l'activité, chez un sujet, d'un polypeptide conforme à l'invention.

Ainsi, il est possible d'administrer au sujet une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent inhibiteur et/ou d'un anticorps tels que
30 définis précédemment, éventuellement en combinaison, avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Il est également possible de diminuer la production endogène d'un polypeptide de l'invention par administration au sujet d'un polynucléotide complémentaire conforme à l'invention permettant d'inhiber l'expression d'un polynucléotide de l'invention.

5

PARTIE EXPERIMENTALE

Exemple 1 : Modélisation de la protéine codée par le polynucléotide de séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 et de la protéine codée par la 10 **séquence nucléotidique du gène sauvage de référence**

Dans une première étape la structure tridimensionnelle de IFN α -2 a été construite à partir de celle de l'IFN α -2 humain dont la structure est disponible dans la base de données PDB (code 1ITF) et ce en utilisant le logiciel Modeler (MSI, San Diego, CA).

15

Le fragment polypeptidique mature a ensuite été modifié de façon à reproduire la mutation observée.

Un millier d'étapes de minimisations moléculaires ont été conduites sur cette structure en utilisant les programmes AMBER et DISCOVER (MSI).

20

Deux suites de calculs de dynamiques moléculaires ont ensuite été effectuées avec le même programme et les mêmes champs de forces.

Dans chaque cas, 50000 étapes ont été calculées à 300°K, terminées par 300 étapes d'équilibration.

Le résultat de cette modélisation est visualisé sur la Figure 1.

25

Exemple 2 : Génotypage du polymorphisme de type SNP conforme à l'invention dans une population d'individus

Le génotypage de SNPs est basé sur le principe du miniséquençage dont le produit est détecté par une lecture de fluorescence polarisée. La technique consiste en un miniséquençage fluorescent
30 (Technologie FP-TDI ou Fluorescence Polarization Template-direct Dye-terminator Incorporation).

Le miniséquençage consiste à allonger un oligonucléotide amorce, placé juste en amont du site polymorphe, par des didéoxynucléotides fluoromarkés à l'aide d'une enzyme polymérase. Le résultat de cet allongement est directement analysé par une lecture de fluorescence polarisée.

5

A) Protocole

Le miniséquençage est réalisé sur un produit obtenu après amplification par PCR à partir de l'ADN génomique de chaque individu de la population d'individus d'un fragment de séquence nucléotidique du IFN α -2.

10 Ce produit PCR est choisi pour couvrir la région génique contenant le polymorphisme de type SNP de l'invention. Ensuite, on élimine les amorces de PCR et les dNTPs non incorporés avant de réaliser le miniséquençage. Toutes ces étapes, ainsi que la lecture, sont réalisées dans la même plaque.

15 Le génotypage requiert donc 5 étapes :

- 1) Amplification par PCR
- 2) Purification du produit de PCR par digestion enzymatique
- 3) Elongation de l'oligonucléotide amorce
- 4) Lecture
- 20 5) Interprétation de la lecture

1) L'amplification PCR de la séquence nucléotidique du gène IFN α -2 qui couvre la région génique contenant le polymorphisme de type SNP fonctionnel conforme à l'invention est effectuée pour chaque individu de la
25 population d'individus.

La population d'individus est composée d'ADNs génomiques fournis par l'Institut Coriell aux Etats-Unis.

Les 239 individus se répartissent comme suit :

POPULATION	DESCRIPTION	NOMBRE D'INDIVIDUS
1	Afro Américain	50
2	Amérindien du Sud Ouest	5
3	Sud Américain (Andes)	10
4	Caribéen	10
5	Caucasien	50
6	Chinois	10
7	Grec	8
8	Ibérien	10
9	Italien	10
10	Japonais	10
11	Mexicain	10
12	Moyen-Orient	20
13	Individus du Pacifique	7
14	Indo-Pakistanaï	9
15	Sud Américain	10
16	Asie du Sud	10

L'amplification PCR est réalisée à partir d'amorces que l'homme du métier peut facilement déterminer à l'aide de la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1.

5 Les amorces sont les suivantes : ID SEQ N° 4 et ID SEQ N° 5

Ces séquences nucléotidiques permettent d'amplifier un fragment d'une longueur de 655 nucléotides, du nucléotide 470 au nucléotide 1124 de la séquence nucléotidique ID SEQ N 1.

10 Les amplifiats PCR serviront de matrice pour la réaction de miniséquençage.

Le volume réactionnel est de 5 µl par échantillon comme décrit dans le tableau suivant :

Fournisseur	Référence	Réactif	Conc. Initiale	Vol. par tube (µl)	Conc. finale
Life Technologie	Livré avec Taq	Tampon (X)	10	0,5	1
Life Technologie	Livré avec Taq	MgSO ₄ (mM)	50	0,2	2
AP Biotech	27-2035-03	dNTPs (mM)	10	0,1	0,2
	Sur demande	Amorce F (µM) ID SEQ N° 4	10	0,1	0,2
	Sur demande	AmorceR (µM) ID SEQ N° 5	10	0,1	0,2
Life Technologie	11304-029	Taq platinum	5U/ µl	0,02	0,1 U/ réaction
		H ₂ O	Qsp 5 µl	1,98	
		ADN	2,5 ng/ µl	2	5 ng/ réaction
		Volume total		5 µl	

Ces réactifs sont distribués dans une plaque PCR noire à 384 puits fournie par ABGene (ref :TF-0384-k). Une fois remplie, la plaque est scellée, centrifugée puis placée dans un thermocycleur pour plaque 384 (Tetrad de MJ Research) et subit l'incubation suivante : Cycles de PCR : 1 min à 94° C, suivi de 36 cycles composés de 3 étapes (15 sec. à 94° C, 30 sec. à 56° C, 1 min. à 68° C).

2) La PCR est ensuite purifiée à l'aide de deux enzymes que sont la phosphatase alcaline de crevette (ou Shrimp Alkaline Phosphatase SAP) et l'exonucléase I (Exo I). La première de ces enzymes permet la déphosphorylation des dNTPs non incorporés au cours de la PCR, tandis que la seconde élimine les résidus simple brin d'ADN et donc les amorces non utilisées au cours de la PCR. Cette digestion se fait par addition dans la plaque de PCR d'un mélange réactionnel de 5 µl par échantillon préparé comme décrit dans le tableau suivant :

Fournisseur	Référence	Réactif	Conc. initiale	Vol. par tube (μ l)	Conc. finale
AP Biotech	E70092X	SAP	1 U/ μ l	0,5	0,5/ réaction
AP Biotech	070073Z	Exo I	10 U/ μ l	0,1	1/ réaction
AP Biotech	Fourni avec SAP	Tampon SAP (X)	10	0,5	1
		H ₂ O	Qsp 5 μ l	3,9	
		PCR		5 μ l	
		Vol total		10 μ l	

Une fois remplie, la plaque est scellée, centrifugée puis placée dans un thermocycleur pour plaque 384 puits (Tetrad de MJ Research) et subit l'incubation suivante : Digestion SAP-EXO : 45 min à 37° C, 15 min à 80° C.

5

3) L'étape d'élongation ou de miniséquençage est ensuite réalisée sur ce produit de PCR digéré, par addition d'un mélange réactionnel de 5 μ L par échantillon préparé comme indiqué dans le tableau suivant :

Fournisseur	Référence	Réactif	Conc. Initiale	Vol. par tube (µl)	Conc. finale
Propre préparation		Tampon Elongation ¹ (X)	5	1	1
Life Technologies	Sur demande	Amorce Miniseq (µM) A ou B	10	0,5	1
AP Biotech	27-2051 (61,71,81)-01	ddNTPs ² (µM) 2 non marqués	2,5 de chaque	025	0,125 de chaque
NEN	Nel 472/5 et Nel 492/5	ddNTPs ² (µM) 2 marqués Tamra et R110	2,5 de chaque	0,25	0,125 de chaque
AP Biotech	E79000Z	Thermo-sequenase	3,2 U/ µl	0,125	0,4 U/ réaction
		H2O	Qsp 5 µl	3,125	
		PCR digérée		10 µl	
		Vol total		15 µl	

¹ Le tampon élongation : Le tampon élongation 5X est composé de Tris-HCl pH 9 à 250 mM, de KCl à 250 mM, de NaCl à 25 mM, de MgCl₂ à 10 mM et de glycérol à 40 %.

- ² ddNTPs : Pour les ddNTPs, un mélange des 4 bases est réalisé en fonction du polymorphisme étudié. Seulement les 2 bases d'intérêts (G/ A) composant le polymorphisme de type SNP fonctionnel portent un marquage, soit en Tamra, soit en R110. Le mélange de ddNTPs est composé de :
- 2,5 µM de ddCTP non marqué,
 - 2,5 µM de ddTTP non marqué,
 - 2,5 µM de ddGTP (1,825 µM de ddGTP non marqué et 0,625 µM de ddGTP marqué au Tamra),
 - 2,5 µM de ddATP (1,825 µM de ddATP non marqué et 0,625 µM de ddATP marqué au R110).

Une fois remplie, la plaque est scellée, centrifugée puis placée dans un thermocycleur pour plaque 384 puits (Tetrad de MJ Research) et subit l'incubation suivante : Cycles d'élongation : 1 min. à 93° C, suivi de 35 cycles composés de 2 étapes (10 sec. à 93° C, 30 sec. à 55° C).

Après la dernière étape dans le thermocycleur, la plaque est directement placée sur un lecteur de fluorescence polarisée de type Analyst® HT de LJL Biosystems Inc.. La plaque est lue à l'aide du logiciel Criterion Host® en utilisant deux méthodes. La première permet de lire la base marquée en Tamra en utilisant les filtres d'excitation et d'émission spécifiques

de ce fluorophore (excitation 550-10 nm, émission 580-10 nm) et la seconde permet de lire la base marquée en R110 en utilisant les filtres d'excitation et d'émission spécifiques de ce fluorophore (excitation 490-10 nm, émission 520-10 nm). Dans les deux cas, un miroir double dichroïque (R110/Tamra) est
 5 utilisé et les autres paramètres de lecture sont :

Z-height : 1,5 mm

Attenuator : out

Temps d'intégration : 100,000 µsec.

Raw data units : counts/sec

10 Switch polarization : by well

Plate settling time : 0 msec

PMT setup : Smart Read (+), sensitivity 2

Dynamic polarizer : emission

Static polarizer : S

15 Un fichier résultat est alors obtenu contenant les valeurs calculées de mP pour le filtre Tamra et celle pour le filtre R110. Ces valeurs de mP sont calculées à partir des valeurs d'intensité obtenues sur le plan parallèle(//) et sur le plan perpendiculaire (⊥) d'après la formule suivante :

$$mP = 1000(// - g\perp)/(// + g\perp).$$

20 Dans ce calcul, la valeur sur le filtre ⊥ est pondérée d'un facteur g. Celui-ci est un paramètre machine qui doit être déterminé préalablement expérimentalement.

4) et 5) Interprétation de la lecture et détermination des
 25 géotypes.

Les valeurs de mP sont reportées sur un graphe à l'aide du logiciel Excel de Microsoft Inc., et/ou du logiciel Allele Caller® développé par LJL Biosystems Inc.

En abscisse est indiquée la valeur de mP de la base marquée au
 30 Tamra, en ordonnée est indiquée la valeur de mP de la base marquée au R110. Une forte valeur de mP indique que la base marquée avec ce fluorophore est incorporée et, inversement, une faible valeur de mP révèle l'absence

d'incorporation de cette base.

On obtient jusqu'à trois groupes homogènes de séquences nucléotidiques ayant des génotypes différents, comme indiqué dans la Figure 2.

L'utilisation du logiciel Allèle Caller® permet, une fois le repérage
5 des différents groupes réalisé, d'extraire directement le génotype défini pour chaque individu sous forme d'un tableau.

Les séquences des deux amorces de miniséquençage nécessaires pour le génotypage ont été déterminées. Ces amorces sont sélectionnées pour correspondre à une vingtaine voire une trentaine de
10 nucléotides placés juste en amont du site polymorphe. Du fait que le produit de PCR contenant un SNP est un produit d'ADN double brin, le génotypage peut donc se faire soit sur le brin sens soit sur le brin antisens. Les amorces sélectionnées sont fabriquées par Life Technologies Inc.

Les amorces du miniséquençage sont les suivantes :

15 Amorce sens : (A) : gttgtcagagcagaaatcat

Amorce antisens : (B) : gttgacaaagaaaaagatct

Le miniséquençage du polymorphisme de type SNP g1023a a d'abord été validé sur 16 échantillons, puis génotypé sur l'ensemble de la population d'individus composée de 239 individus et 7 blancs.

20 Conditions de miniséquençage testées :

Condition N° 1 :

Amorce sens + ddGTP-R110 + ddATP-Tamra

Condition N° 2 :

Amorce sens + ddATP-R110 + ddGTP-Tamra

25 Condition N° 3 :

Amorce antisens + ddCTP-R110 + ddTTP-Tamra

Condition N° 4 :

Amorce antisens + ddTTP-R110 + ddCTP-Tamra

Ces 4 conditions ont été testées et la condition N° 2 a été retenue
30 pour le génotypage.

B) Résultats

Après la réalisation complète du processus de génotypage, la détermination des génotypes des individus de la population d'individus pour la SNP fonctionnel étudié ici a été réalisée à l'aide du graphe représenté sur la Figure 2.

Ce génotype est en théorie soit homozygote GG, soit hétérozygote GA, soit homozygote AA chez les individus testés. En réalité et comme montré ci-dessous, le génotype homozygote AA n'est pas détecté dans la population d'individus.

Les résultats des contrôles, de la répartition des génotypes déterminés dans la population d'individus et le calcul des différentes fréquences alléliques pour ce polymorphisme de type SNP fonctionnel sont présentés dans les tableaux suivants :

Nombre d'individus		Nombre de blanc		Pourcentage de réussite
testés	génotypés	testés	validés	
239	238	7	7	99,6

POPULATION	N	%	Fréquence allélique			Génotype AA		Génotype AG		Génotype GG	
			%	95 % IC		N	%	N	%	N	%
Afro Américain	50	20,9	0	-	-	0	0	0	0	50	100
Amérindien du Sud Ouest	5	2,1	0	-	-	0	0	0	0	5	100
Sud Américain (Andes)	10	4,2	5,0	-	-	0	0	0	0	9	100
Caribéen	10	4,2	0	0,0	14,6	0	0	1	10,0	9	90
Caucasien	50	20,9	0	-	-	0	0	0	0	50	100
Chinois	10	4,2	0	-	-	0	0	0	0	10	100
Grec	8	3,3	0	-	-	0	0	0	0	9	100
Ibérien	10	4,2	0	-	-	0	0	0	0	10	100
Italien	10	4,2	0	-	-	0	0	0	0	10	100
Japonais	10	4,2	0	-	-	0	0	0	0	10	100
Mexicain	10	4,2	0	-	-	0	0	0	0	10	100
Moyen-Orient	20	8,4	0	-	-	0	0	0	0	20	100
Individus du Pacifique	7	2,9	0	-	-	0	0	0	0	7	100
Indo-Pakistanaï	9	3,8	0	-	-	0	0	0	0	9	100
Sud Américain	10	4,2	0	-	-	0	0	0	0	10	100
Asie du Sud	10	4,2	0	-	-	0	0	0	0	10	100
Total	239	100 %	0,210	0,0	0,6	0	0	1	0,4	238	99,6

Dans le tableau ci-dessus,

- N représente le nombre d'individus,
- % représente le pourcentage d'individus dans la sous-population spécifique,
- la fréquence allélique représente le pourcentage de l'allèle muté dans la sous-population spécifique,
- 95 % IC représente l'intervalle minimal et maximal de confiance à 95 %.

En examinant ces résultats par population, on constate que le seul individu hétérozygote est issu de la sous-population caribéenne de la population d'individus.

Exemple 3 : Etude de la fonction biologique de IFN α -2 mutant M171 I comparée à celle de l'IFN α -2 sauvage

1) Clonage des IFNs α -2 sauvage et muté (M171I) dans le vecteur d'expression procaryote pTrc/His-topo:

La séquence nucléotidique codant pour l'IFN α -2 sauvage ou muté est amplifiée par PCR, comme il est mentionné dans le génotypage de l'exemple 2.

Ces produits PCR sont insérés dans le vecteur d'expression procaryote pTrc/His-Topo sous le contrôle du promoteur hybride Trc inducible par l'IPTG (Iso-Propyl-Thio-Galactoside) par TOPOTM-cloning (Invitrogen Corp.).

Ce vecteur permet l'expression hétérologue de protéines eucaryotes dans la bactérie grâce à la présence d'une unité mini-cistronique.

La protéine sauvage et la protéine mutée sont produites sous forme de protéines de fusion portant une extension en N-terminal constituée d'une queue 6-histidines et de l'épitope pour un anticorps spécifique.

Il est possible de cliver cette région additionnelle en utilisant l'endoprotéase Entérokinase.

Après vérification de la séquence nucléotidique de la région du vecteur codant pour les protéines recombinantes, la souche d'*E.coli* Top 10 (Invitrogen) est transformée avec ces vecteurs d'expression recombinants.

2) Expression hétérologue chez *E. Coli* et purification des protéines de fusion IFN α -2 sauvage et mutée M171I poly-histidine :

Deux pré-cultures saturantes de 100 ml de milieu LBA (Luria
5 BERTONI + ampicilline 100 μ g/ml), contenant respectivement un clone codant pour l'IFN α -2 sauvage et pour l'IFN α -2 M171I, ont été réalisées pendant une nuit à 37°C à une agitation de 200 rpm puis ont été utilisées pour ensemen-
cer au 1/10 900 ml de milieu LBA (pré-incubé la nuit à 37°C).

Lorsque cette seconde culture atteint une densité cellulaire
10 correspondant à une densité optique D.O_{600nm} de 0,8, l'expression de la protéine poly-histidine est induite par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM et est maintenue pendant 5 heures à 30°C avec une agitation de la culture à 200 rpm.

Le culot de bactéries obtenu après centrifugation à 4000 x g,
15 30 min, 4°C, est resuspendu dans 25 ml de tampon A (Tris 50 mM, pH 8, NaCl 50 mM, imidazole 10 mM, PMSF 0,1 mM pH 8).

Une pré-incubation de 30 min dans la glace en présence de 0,5 mg/ml de lysozyme et de 20 unités de DNase I précède une sonication réalisée en trois étapes avec contrôle de la température de l'échantillon (une étape a
20 délivré 240 Watt par impulsion de 10 sec avec 10 sec d'arrêt et ce pendant 1 min). La suspension cellulaire est ensuite clarifiée par centrifugation à 15000 x g pendant 30 minutes, à 4°C.

Le surnageant de centrifugation est ensuite filtré sur 0,22 micromètre.

25 Les protéines poly-histidines présentes sont alors purifiées par HPLC sur résine HiTrapTM Nickel Affinity (Amersham Pharmacia Biotech) préalablement équilibrée en 50 mM Tris, 300 mM NaCl pH 8,0 (Tampon B). Après avoir lavé abondamment la colonne avec 1 M NaCl dans 50 mM Tris pH 8,0, l'élution des protéines a été induite par un gradient linéaire d'imidazole
30 entre des concentrations de 0,01-0,25 M dans le tampon B.

La présence de la protéine poly-histidine dans les fractions collectées est vérifiée d'une part par électrophorèse de type SDS PAGE et

d'autre part par immuno-détection à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre l'extrémité N-terminale de la protéine de fusion.

A ce stade, la protéine d'intérêt est pure à hauteur de 80%.

La dernière étape de la purification consiste en une séparation des
5 protéines sur colonne de chromatographie d'échange d'ions.

Les fractions contenant la protéine de fusion sont injectées sur une colonne échangeuse d'anions (MiniQ PE 4,6/50, Pharmacia) préalablement équilibrée en tampon Tris 50 mM pH 8. L'élution des protéines est réalisée par le passage d'un gradient de NaCl entre 0 et 500 mM dans le tampon Tris
10 50 mM pH 8.

La pureté de la protéine d'intérêt est estimée sur gel SDS/PAGE et les concentrations en protéine ont été mesurées par dosage BCA (acide bicinchoninique et sulfate de cuivre, Sigma).

Les protéines IFN α -2 sauvage et mutée purifiées contenant
15 l'extrémité poly-histidine en N-terminal sont utilisées lors des tests fonctionnels qui consistent en une mesure de l'activité anti-proliférative de ces deux formes de l'IFN α -2 sur la croissance de la lignée cellulaire de type Daudi.

3. Evaluation de la capacité de l'IFN α -2 sauvage et muté M171I à induire 20 l'anti-prolifération des cellules de lymphoblastes humains de la lignée cellulaire Daudi Burkitt's

Ces tests sont effectués sur deux types d'IFNs α -2 différents à savoir : l'IFN α -2 non muté et l'IFN α -2 M171I. Des cellules (lymphoblastes humains de la lignée cellulaire Daudi Burkitt's) préalablement cultivées dans du milieu RPMI 1640 (supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Foetal et 2 mM de L-Glutamine) sont ensemencées en plaque 96 puits à la densité cellulaire de
25 $4 \cdot 10^4$ cellules/ puits.

Pour chacun des IFNs, des concentrations finales de 0,003 pM à 600 nM sont testées.

30 Huit cultures et donc mesures différentes sont faites en parallèle pour les deux protéines et ceci pour chaque concentration.

Les cellules Daudi sont ensuite cultivées pendant 66 heures à

37°C sous 5% CO₂.

Après les 66 heures de croissance, l'effet anti-prolifératif de chaque IFN α -2 est estimé par le nombre de cellules vivantes présentant encore une activité des déshydrogénases mitochondriales. L'activité de ces
5 déshydrogénases peut être détectée en présence de 12 mM de MTT (incubé 4 heures à 37°C), par le suivi de la densité optique à 550 nm correspondant à la formation de cristaux de formazan issus du clivage du sel de tétrazolium MTT.

L'activité d'anti-prolifération de l'IFN α -2 sauvage ou mutée M171I est basée sur les mesures de l'IC 50, correspondant à la concentration en
10 IFN α -2 inhibant 50 % la croissance cellulaire.

Les résultats obtenus sont illustrés sur la Figure 3.

Les points de mesure pour chaque concentration de protéine sauvage et mutée (M171I) représentés sur le graphe sont la moyenne pour chaque des quatre mesures prises sur les quatre cultures faites en parallèle
15 pour chacune des protéines et des concentrations.

Ce test permet d'observer que l'activité anti-proliférative cellulaire est fortement inhibée dans le cas de l'IFN α -2 muté M171I par rapport à l'IFN α -2 sauvage.

LISTE DE SEQUENCES

	<110>	Genodyssee	
5	<120>	Nouveaux polynucléotides comportant chacun un seul polymorphisme de type SNP fonctionnel dans la séquence nucléotidique du gène INF alpha 2 humain ainsi que de nouveaux polypeptides codés par ces polynucléotides et leurs utilisations thérapeutiques.	
10	<130>	M171I	
	<140>		
	<141>		
15	<160>	5	
	<170>	PatentIn Ver. 2.1	
20	<210>	1	
	<211>	1733	
	<212>	ADN	
	<213>	Homo sapiens	
25	<400>	1	
	gcgcctctta	tgtacccaca.aaaatctatt	ttcaaaaaag ttgctctaag aatatagtta 60
	tcaagttaag	taaaatgtca atagcctttt	aatttaattt ttaattgttt tatcattctt 120
	tgcaataata	aaacattaac tttatacttt	ttaatttaat gtatagaata gagatataca 180
30	taggatatgt	aaatagatac acagtgtata	tgtgattaaa atataatggg agattcaatc 240
	agaaaaaagt	ttctaaaaag gctctggggg	aaaagaggaa ggaaacaata atgaaaaaaa 300
	tgtggtgaga	aaaacagctg aaaacccatg	taaagagtgt ataaagaaag caaaaagaga 360
	agtagaaaag	aacacagggg catttggaag	atgtaaacga gtatgttccc tatttaaggc 420
	taggcacaaa	gcaaggtctt cagagaacct	ggagcctaag gtttaggctc acccatttca 480
35	accagtctag	cagcatctgc aacatctaca	atggccttga cctttgcttt actggtggcc 540
	ctcctgggtg	tcagctgcaa gtcaagctgc	tctgtgggct gtgatctgcc tcaaacccac 600
	agcctgggta	gcaggaggac cttgatgctc	ctggcacaga tgaggagaat ctctcttttc 660
	tcctgcttga	aggacagaca tgacttttga	tttccccagg aggagtttgg caaccagttc 720
	caaaaggctg	aaaccaatccc tgccctccat	gagatgatcc agcagatctt caatctcttc 780
40	agcacaaaag	actcatctgc tgcttgggat	gagaccctcc tagacaaatt ctacactgaa 840
	ctctaccagc	agctgaatga cctggaagcc	tgtgtgatac agggggtggg ggtgacagag 900
	actccccctg	tgaaggagga ctccattctg	gctgtgagga aatacttcca aagaatcact 960
	ctctatctga	aagagaagaa atacagccct	tgtgcctggg aggttgtcag agcagaaatc 1020
	ataagatctt	tttctttgtc aacaaaactg	caagaaagtt taagaagtaa ggaatgaaaa 1080
45	ctggttcaac	atggaaatga ttttcattga	ttcgatgccc agctcacctt tttatgatct 1140
	gccatttcaa	agactcatgt ttctgctatg	accatgacac gattttaaate ttttcaaagt 1200
	tttttaggag	tattaatcaa cattgtattc	agctcttaag gcactagtcc cttacagagg 1260
	accatgctga	ctgatccatt atctatttaa	atatttttaa aatattattt atttaactat 1320
	ttataaaaac	acttattttt gttcatatta	tgatcatgtgc acctttgcac agtgggttaat 1380
50	gtaataaaat	gtgttctttg tattttggtt	atattattttg tgttgttcat tgaacttttg 1440
	ctatggaact	tttgacttgg tttattcttt	aaaatgaaat tccaagccta attgtgcaac 1500
	ctgattacag	aataactggg acacttccat	tgtccatcaa tattatatcc aagatataag 1560
	taaaaataaa	ctttctgtaa accaagttgt	atgttgtact caagataaca ggggtgaacct 1620
	aacaaatata	attctgctct ctgtgtgatt	tgatttttgg atgaaaaaaa ctaaaaatgg 1680
55	taatcatact	taattatcag ttatggtaaa	tggtatgaag agaagaagga acg 1733

44

<210> 2
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens.

5

<400> 2
 Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
 1 5 10 15

10

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
 20 25 30

Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
 35 40 45

15

Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
 50 55 60

20

Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His
 65 70 75 80

Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser
 85 90 95

25

Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr
 100 105 110

Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val
 115 120 125

30

Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys
 130 135 140

35

Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro
 145 150 155 160

Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Ile Arg Ser Phe Ser Leu
 165 170 175

40

Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
 180 185

45

<210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50

<400> 3
 agcagaaatc ataagatctt 20

55

<210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 cacccatttc aaccagtcta 20

45

5 <210> 5
<211> 19
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 5
agctggcata cgaatcaat

19

REVENDEICATIONS

1. Polynucléotide isolé comprenant :

- 5 a) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 et ayant la même, ou pratiquement la même fonctionnalité que la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1,
- b) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence nucléotidique codante de la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 et ayant la même, ou pratiquement la même fonctionnalité que la séquence
10 nucléotidique ID SEQ N° 1, ou
- c) une séquence nucléotidique complémentaire à la séquence nucléotidique sous a) ou sous b).

2. Polynucléotide isolé comprenant :

- 15 a) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 et comportant la séquence nucléotidique ID SEQ N° 3,
- b) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence nucléotidique codante de la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 et comportant la séquence nucléotidique ID SEQ N° 3, ou
- 20 c) une séquence nucléotidique complémentaire à la séquence nucléotidique sous a) ou sous b).

3. Polynucléotide isolé, comprenant :

- a) la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1,
- b) la séquence nucléotidique codante de la séquence nucléotidique ID SEQ
25 N° 1, ou
- c) la séquence nucléotidique complémentaire à la séquence nucléotidique sous a) ou b).

- 4. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou
30 sa séquence codante.

- 5. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide comprenant :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou
- b) la séquence d'acides aminés comprenant les acides aminés compris entre 24 et 188 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2.

6. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5,
5 caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'ADN ou d'ARN.

7. Utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour identifier, hybrider et/ou amplifier tout ou partie d'un polynucléotide comportant le polymorphisme de type SNP g1023a du gène IFN α -2.

10 8. Utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, comme outil de génotypage.

9. Procédé de détermination de la fréquence du polymorphisme de type SNP d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel on procède à un génotypage chez un individu ou dans une
15 population d'individus.

10. Procédé de détermination selon la revendication 9, dans lequel le génotypage est effectué par miniséquençage.

11. Procédé de détermination selon la revendication 10, dans lequel le miniséquençage est réalisé avec les amorces sens et antisens
20 correspondant respectivement aux séquences nucléotidique ID SEQ N° 4 et ID SEQ N° 5.

12. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour la recherche d'une variation de séquence dans la séquence nucléotidique du gène IFN α -2 chez un individu.

25 13. Vecteur recombinant comprenant un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

14. Cellule hôte comprenant un vecteur recombinant selon la revendication 13.

15. Procédé de préparation d'un polypeptide, caractérisé en ce
30 qu'une cellule hôte selon la revendication 14 est cultivée et ledit polypeptide est isolé du milieu de culture.

16. Polypeptide isolé comprenant :

- a) une séquence d'acides aminés ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 et ayant la même ou pratiquement la même fonctionnalité que la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou
- b) une séquence d'acides aminés ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 188 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 et ayant la même ou pratiquement la même fonctionnalité que la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2.

17. Polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 188 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2.

18. Polypeptide selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 ou la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 188 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2.

19. Procédé d'obtention d'un anticorps immunospcifique, caractérisé en ce qu'il est obtenu par immunisation d'un animal avec un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18.

20. Anticorps immunospcifique pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18.

21. Procédé d'identification d'un agent activateur ou inhibiteur d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, comprenant :

- a) la mise en présence de cellules hôtes selon la revendication 14 avec un agent à tester, et
- b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur généré par l'agent à tester.

22. Méthode pour l'identification d'un agent activé ou inhibé par un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, comprenant :

- a) la mise en présence de cellules hôtes selon la revendication 14 avec un agent à tester, et
- b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur généré par un polypeptide sur l'agent à tester.

REVENDEICATIONS

1. Polynucléotide isolé comprenant :

- 5 a) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 et ayant la même, ou pratiquement la même fonctionnalité que la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1,
- b) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence nucléotidique codante de la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 et ayant la même, ou pratiquement la même fonctionnalité que la séquence
10 nucléotidique ID SEQ N° 1, ou
- c) une séquence nucléotidique complémentaire à la séquence nucléotidique sous a) ou sous b).

2. Polynucléotide isolé comprenant :

- 15 a) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 et comportant la séquence nucléotidique ID SEQ N° 3,
- b) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence nucléotidique codante de la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 et comportant la séquence nucléotidique ID SEQ N° 3, ou
- 20 c) une séquence nucléotidique complémentaire à la séquence nucléotidique sous a) ou sous b).

3. Polynucléotide isolé, comprenant :

- a) la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1,
- 25 b) la séquence nucléotidique codante de la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1, ou
- c) la séquence nucléotidique complémentaire à la séquence nucléotidique sous a) ou b).

- 30 4. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante.

5. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide comprenant :

23. Procédé de détection de l'expression et/ou de l'activité d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, comprenant :

- a) la détection de la présence ou de l'absence d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 dans le génome du sujet, et/ou
- 5 b) la détection de la présence, de l'absence et/ou d'une concentration prédéterminée d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, dans un échantillon biologique du sujet.

24. Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18.

- 10 25. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la
- 15 tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la
- 20 dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les désordres gastro-intestinaux et les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

- 25 26. Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, un vecteur recombinant selon la revendication 13, une cellule hôte selon la revendication 14 et/ou un anticorps selon la revendication 20.

- 30 27. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, d'un vecteur recombinant selon la revendication 13, d'une cellule hôte selon la revendication 14 et/ou d'un anticorps selon la revendication 20, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou
 - b) la séquence d'acides aminés comprenant les acides aminés compris entre 24 et 188 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2.
6. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'ADN ou d'ARN.
7. Utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour identifier, hybrider et/ou amplifier tout ou partie d'un polynucléotide comportant le polymorphisme de type SNP g1023a du gène IFN α -2.
8. Utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, comme outil de génotypage.
9. Procédé de détermination de la fréquence du polymorphisme de type SNP d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel on procède à un génotypage chez un individu ou dans une population d'individus.
10. Procédé de détermination selon la revendication 9, dans lequel le génotypage est effectué par miniséquençage.
11. Procédé de détermination selon la revendication 10, dans lequel le miniséquençage est réalisé avec les amorces sens et antisens correspondant respectivement aux séquences nucléotidique ID SEQ N° 4 et ID SEQ N° 5.
12. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour la recherche d'une variation de séquence dans la séquence nucléotidique du gène IFN α -2 chez un individu.
13. Vecteur recombinant comprenant un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.
14. Cellule hôte comprenant un vecteur recombinant selon la revendication 13.
15. Procédé de préparation d'un polypeptide, caractérisé en ce qu'une cellule hôte selon la revendication 14 est cultivée et ledit polypeptide est isolé du milieu de culture.
16. Polypeptide isolé comprenant :

traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne
 5 sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie chez les
 10 patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les désordres gastro-intestinaux et les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

28. Composition pharmaceutique renfermant à titre de principe
 15 actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, un vecteur recombinant selon la revendication 13, une cellule hôte selon la revendication 14 et/ou un anticorps selon la revendication 20, ainsi qu'un excipient pharmaceutiquement acceptable.

20 29. Composition de diagnostic renfermant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, un vecteur recombinant selon la revendication 13, une cellule hôte selon la revendication 14 et/ou un anticorps selon la revendication 20, ainsi qu'un excipient approprié
 25 pharmaceutiquement acceptable.

30. Utilisation :

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, et/ou
 - b) d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, et/ou
 - 30 c) d'une cellule hôte selon la revendication 14, cette cellule provenant du sujet à traiter,
- pour préparer un médicament destiné à augmenter l'expression ou l'activité d'un

- a) une séquence d'acides aminés ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 et ayant la même ou pratiquement la même fonctionnalité que la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou
- b) une séquence d'acides aminés ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 188 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 et ayant la même ou pratiquement la même fonctionnalité que la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2.

17. Polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 188 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2.

18. Polypeptide selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 ou la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 188 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2.

19. Procédé d'obtention d'un anticorps immunospcifique, caractérisé en ce qu'il est obtenu par immunisation d'un animal avec un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18.

20. Anticorps immunospcifique pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18.

21. Procédé d'identification d'un agent activateur ou inhibiteur d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, comprenant :

- a) la mise en présence de cellules hôtes selon la revendication 14 avec un agent à tester, et
- b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur généré par l'agent à tester.

22. Agent activateur ou inhibiteur, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être identifié par la méthode selon la revendication 21.

23. Méthode pour l'identification d'un agent activé ou inhibé par un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, comprenant :

- a) la mise en présence de cellules hôtes selon la revendication 14 avec un agent à tester, et

polypeptide chez un sujet selon l'une quelconque des revendications 16 à 18.

31. Utilisation

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un anticorps selon la revendication 20, et/ou
- 5 b) d'un polynucléotide permettant d'inhiber l'expression d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour préparer un médicament destiné à diminuer l'expression ou l'activité d'un polypeptide chez un sujet selon l'une quelconque des revendications 16 à 18.

b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur généré par un polypeptide sur l'agent à tester.

24. Agent activé ou inhibé, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être identifié par la méthode selon la revendication 23.

5 25. Procédé de détection de l'expression et/ou de l'activité d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, comprenant :

- a) la détection de la présence ou de l'absence d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 dans le génome du sujet, et/ou
- b) la détection de la présence, de l'absence et/ou d'une concentration
10 prédéterminée d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, dans un échantillon biologique du sujet.

26. Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18.

15 27. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques
20 telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de
25 blessures, l'anémie chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les désordres gastro-intestinaux et les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

30 28. Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, un vecteur recombinant selon la revendication 13, une cellule hôte selon la revendication 14, un anticorps selon la revendication 20 et/ou un agent activateur et/ou

inhibiteur selon la revendication 22.

29. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, d'un vecteur recombinant selon la revendication 13, d'une cellule hôte selon la revendication 14, d'un anticorps selon la revendication 20
5 et/ou d'un agent activateur et/ou inhibiteur selon la revendication 22, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires,
10 les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou
15 d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les désordres gastro-intestinaux et les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

20 30. Composition pharmaceutique renfermant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, un vecteur recombinant selon la revendication 13, une cellule hôte selon la revendication 14, un anticorps selon la revendication 20 et/ou un agent
25 activateur et/ou inhibiteur selon la revendication 22, ainsi qu'un excipient pharmaceutiquement acceptable.

31. Composition de diagnostic renfermant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, un vecteur
30 recombinant selon la revendication 13, une cellule hôte selon la revendication 14, un anticorps selon la revendication 20 et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur selon la revendication 22, ainsi qu'un excipient approprié

pharmaceutiquement acceptable.

32. Utilisation :

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent activateur selon la revendication 22, et/ou
- 5 b) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, et/ou
- c) d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, et/ou
- d) d'une cellule hôte selon la revendication 14, cette cellule provenant du sujet à traiter,
- 10 pour préparer un médicament destiné à augmenter l'expression ou l'activité chez un sujet, d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18.

33. Utilisation

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent inhibiteur selon la revendication 22, et/ou
- 15 b) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un anticorps selon la revendication 20, et/ou
- c) d'un polynucléotide permettant d'inhiber l'expression d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6,
- 20 pour préparer un médicament destiné à diminuer l'expression ou l'activité chez un sujet d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 16 à 18.

1/3

Figure 1

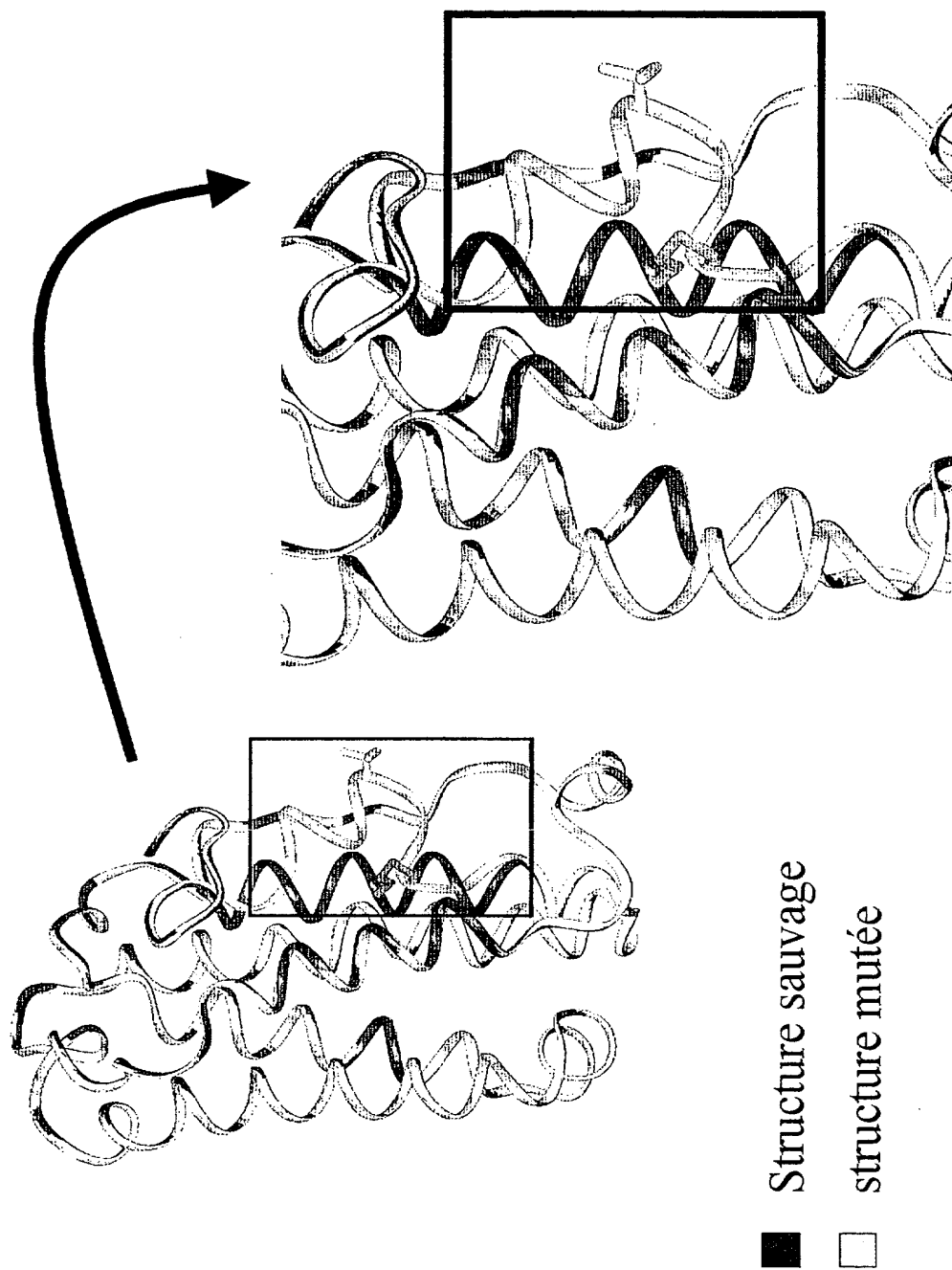


Figure 2

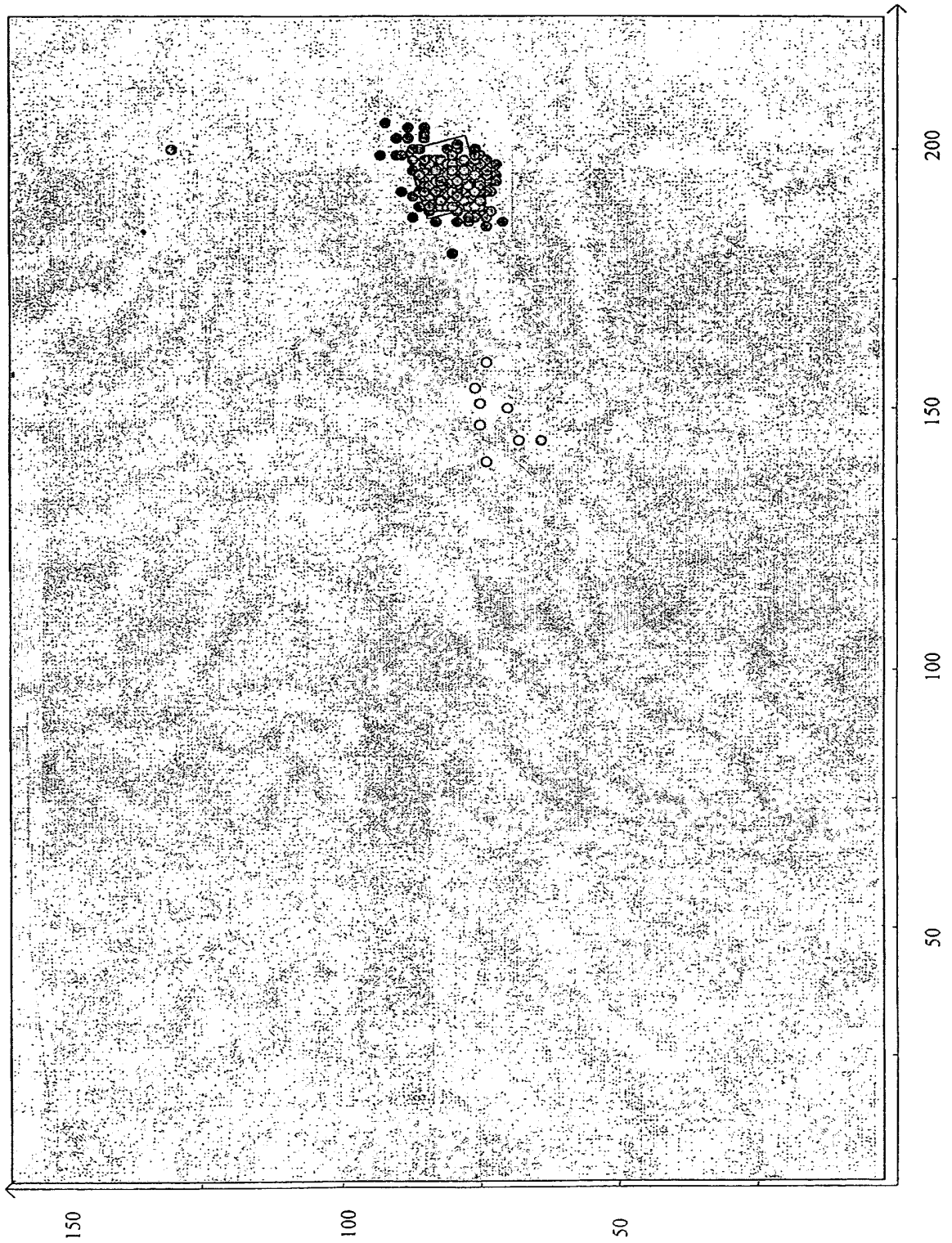
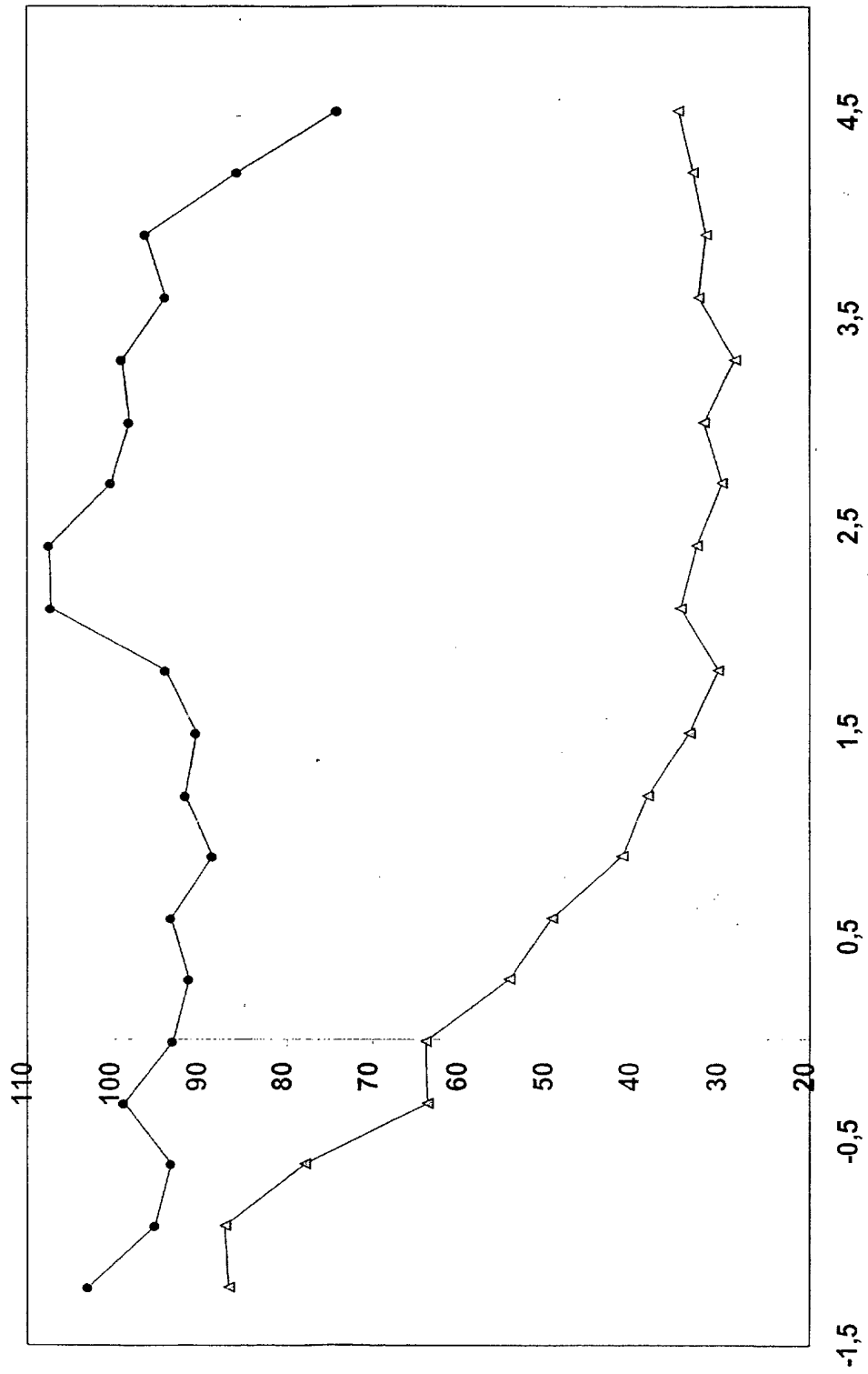


Figure 3



LISTE DE SEQUENCES

<110> Genodyssee

5 <120> Nouveaux polynucléotides comportant chacun un seul polymorphisme de type SNP fonctionnel dans la séquence nucléotidique du gène INF alpha 2 humain ainsi que de nouveaux polypeptides codés par ces polynucléotides et leurs utilisations thérapeutiques.

10

<130> M1711

<140>

<141>

15

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 1733

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25

<400> 1

```

gcgccctctta tgtacccaca aaaatctatt ttcaaaaaag ttgctctaag aatatagtta 60
tcaagttaag taaaatgtca atagcctttt aatttaattt ttaattgttt tatcattctt 120
tgcaataata aaacattaac ttatatactt ttaatttaat gtatagaata gagatataca 180
taggatattgt aaatagatac acagtgtata tgtgattaaa atataatggg agattcaatc 240
agaaaaaagt ttctaaaaag gctctggggg aaaagaggaa ggaaacaata atgaaaaaaa 300
tgtgttgaga aaaacagctg aaaacccatg taaagagtgt ataaagaaaag caaaaagaga 360
agtagaaaagt aacacagggg catttgaaa atgtaaacga gtatgttccc tatttaaggc 420
taggcacaaa gcaaggtctt cagagaacct ggagcctaag gtttaggtc acccatttca 480
taggcacaaa gcaaggtctt cagagaacct ggagcctaag gtttaggtc acccatttca 480
accagtctag cagcatctgc aacatctaca atggccttga cctttgcttt actgggtggc 540
ctcctgggtg tcagctgcaa gtcaagctgc tctgtgggct gtgatctgcc tcaaaccac 600
agcctgggta gcaggaggac cttgatgctc ctggcacaga tgaggagaat ctctcttttc 660
tctgtcttga aggacagaca tgactttgga ttccccagg aggagtttg caaccagttc 720
caaaaggctg aaaccatccc tgtcctccat gagatgatcc agcagatctt caatctcttc 780
agcaciaaagg actcatctgc tgcttgggat gagaccctcc tagacaaatt ctacactgaa 840
ctctaccagc agctgaatga cctggaagcc tgtgtgatac aggggggtgg ggtgacagag 900
actccccctg tgaaggagga ctccattctg gctgtgagga aatacttcca aagaatcact 960
ctctatctga aagagaagaa atacagccct tgtgcctggg aggttgtcag agcagaaatc 1020
ataagatctt tttctttgtc aacaaacttg caagaaagt taagaagtaa ggaatgaaaa 1080
ctgggttcaac atggaaatga ttttcattga ttcgatgcc agctcacctt tttatgatct 1140
gccatttcaa agactcatgt ttctgctatg accatgacac gatttaaattc ttttcaaattg 1200
tttttaggag tattaatcaa cattgtattc agctcttaag gcactagtcc cttacagagg 1260
accatgctga ctgatccatt atctatttaa atatttttaa aatattattt atttaactat 1320
ttataaaaaca acttattttt gttcatatta tgtcatgtgc acctttgcac agtgggtta 1380
50 gtaataaaat gtgttctttg tatttggtta atttattttg tgttgttcat tgaactttt 1440
ctatggaact tttgtacttg tttattcttt aaaatgaaat tccaagccta attgtgcaac 1500
ctgattacag aataactggt acacttcatt tgtccatcaa tattatatc aagatataag 1560
taaaaaataa ctttctgtta accaagttgt atgtgttact caagataaca ggggtgaacct 1620
aacaaatata attctgctct cttgtgtatt tgatttttgt atgaaaaaaa ctaaaaatgg 1680
55 taatcatact taattatcag ttatggtaaa tggtatgaag agaagaagga acg 1733

```

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1 / 1

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 300301

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BIF022952/FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Nouveaux polynucléotides comportant un polymorphisme de type SNP fonctionnel dans la séquence nucléotidique du gène IFNalpha-2 ainsi que de nouveaux polypeptides codés par ces polynucléotides et leurs utilisations thérapeutiques.		
LE(S) DEMANDEUR(S) : GenOdyssee		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).		
Nom		ESCARY
Prénoms		Jean-Louis
Adresse	Rue	4 rue Moxouris
	Code postal et ville	7 8 1 5 0 LE CHESNAY
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Le 26 février 2002 Thierry CAEN N°98.0600 RINUY, SANTARELLI



Creation date: 08-19-2003
Indexing Officer: GKEJELA - GELANA KEJELA
Team: OIPEBackFileIndexing
Dossier: 10087325

Legal Date: 06-10-2002

No.	Doccode	Number of pages
1	NPL	6
2	NPL	14
3	NPL	16

Total number of pages: 36

Remarks:

Order of re-scan issued on

The first part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of the history of the United States is essential for a full understanding of the country and its people. The second part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of the history of the United States is essential for a full understanding of the country and its people. The third part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of the history of the United States is essential for a full understanding of the country and its people. The fourth part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of the history of the United States is essential for a full understanding of the country and its people. The fifth part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of the history of the United States is essential for a full understanding of the country and its people. The sixth part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of the history of the United States is essential for a full understanding of the country and its people. The seventh part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of the history of the United States is essential for a full understanding of the country and its people. The eighth part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of the history of the United States is essential for a full understanding of the country and its people. The ninth part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of the history of the United States is essential for a full understanding of the country and its people. The tenth part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that the study of the history of the United States is essential for a full understanding of the country and its people.